一株海洋石油降解菌的鉴定及表面疏水性研究

王云飞[1], 罗 群[2], 陈庆国[1], 孙午阳[1], 竺柏康[1*]

（1. 浙江海洋大学，浙江 舟山 316022；
2. 中国人民解放军 海军特色医学中心，上海 200433）

摘 要：微生物表面疏水性是影响其吸收和降解疏水性有机物质的主要因素之一。提高微生物表面疏水性有助其黏附于石油烃表面，从而有效减少石油烃的传质距离，提高其生物可利用性。从浙江省舟山市定海港口近岸石油污染的表层海水中，通过富集培养和分离纯化，筛选获得 1 株能以石油烃为唯一碳源且具有表面疏水性的菌株，并对菌株进行生理生化鉴定及 16S rRNA 基因序列进化分析；研究培养时间、盐度、底物、表面活性剂等对菌株表面疏水性的影响。结果表明，该菌株属于假单胞菌属（*Pseudomonas*），与副乳假单胞菌（*Pseudomonas paralactis*）亲缘关系最近，命名为 H2 菌株；在对数生长期和稳定期菌株表面疏水性随培养时间的增加逐渐提高，在衰老期则随培养时间的增加逐渐降低；培养基盐度升高会降低菌株表面疏水性；以疏水性柴油为唯一碳源培养的菌株疏水性远高于以亲水性葡萄糖作为唯一碳源的；在菌株培养过程中加入表面活性剂会使菌株的表面疏水性发生改变，非离子表面活性剂 Tween20、Tween80 分别在质量浓度为 30 mg/L、14 mg/L 时，可提高菌株 H2 的表面疏水性；而阴离子表面活性剂鼠李糖脂、两性离子表面活性剂卵磷脂则降低了菌株 H2 的表面疏水性。

关键词：石油污染；分离和鉴定；副乳假单胞菌；细胞表面疏水性

中图分类号：X172 **文献标志码：**A **文章编号：**1671-6647（2023）02-0309-13

doi: 10.12362/j.issn.1671-6647.20220304002

引用格式： 王云飞, 罗群, 陈庆国, 等. 一株海洋石油降解菌的鉴定及表面疏水性研究[J]. 海洋科学进展, 2023, 41(2)：309-321. WANG Y F, LUO Q, CHEN Q G, et al. Identification and study on surface hydrophobicity of a marine oil-degrading bacteria[J]. Advances in Marine Science, 2023, 41(2)：309-321.

尽管现代工业技术不断完善，但是在采油、钻井、运输等过程中，仍不可避免有大量石油及相关污染物流入海洋中，造成海洋污染[1]。进入海洋中的石油污染物往往对海洋环境造成持久性损害，不仅仅会毒害海洋中的生物，甚至会经食物链积累影响人类的身体健康。因此治理海洋浮油污染意义重大。

利用微生物治理局部海洋石油污染是一种有效的环保的方法，但在实际溢油污染修复中，效果并不理想。在海洋环境中，石油烃的生物可利用性差、接种至海洋环境中的微生物易流失都是重要原因。石油烃从油相到微生物胞内的缓慢传质过程是影响石油降解效率的瓶颈问题之一，也是石油烃的生物可利用性差的重要原因。直接黏附于石油烃表面是有助于微生物克服石油烃生物可利用性差的一种有效途径[2]。微生物的细胞表面疏水性是决定其非特异性黏附于各种生物和非生物表面及

收稿日期：2022-03-04
资助项目：NSCF-浙江两化融合联合基金项目（U1809214）
作者简介：王云飞（1996—），女，硕士研究生，主要从事油气储运与油污染治理技术方面研究.
E-mail：1591898052@qq.com
***通信作者：**竺柏康（1965—），男，教授，硕士生导师，主要从事油气储运与油污染治理技术方面研究.
E-mail：zszbk@zjou.edu.cn

（高 峻 编辑）

界面的重要因素之一，也是影响微生物吸收和降解疏水性有机物质的主要因素之一[3]。微生物可以利用其表面疏水性，在油水交界面黏附于石油烃表面，从而有效地减少石油烃的传质距离，提高其生物可利用性。也可极大地减少微生物由于海水稀释而造成的流失，同时有利于其与氧气的接触，提高石油降解速率。微生物的表面疏水性与菌属种类、生长底物、生长环境和生长周期等因素有关[4]。研究表明许多化学物质可以抑制微生物与疏水性界面的黏附作用，但具有促进微生物与油水界面的黏附的物质却鲜有报道。2015 年和 2017 年有研究表明一些简单的离子化合物，例如硫酸铵盐、阳离子表面活性剂、阳离子聚合物、长链醇类等，可以提高微生物的表面疏水性，促进与石油烃的黏附[5-6]。研究石油烃降解菌的细胞表面疏水性的变化规律，可为其应用于海洋生物修复提供理论参考。

我们从浙江省舟山市定海港口近岸表层海水中分离获得具有表面疏水性的石油降解菌，进行形态观察和生理生化实验鉴定，采用 16S rRNA 基因序列对菌株进行分子鉴定；研究菌株表面疏水性的变化规律，为生物修复用菌剂的制备（如菌株扩大培养、发酵等）提供提高表面疏水性的方法，使得在实际海洋环境中添加的菌株具有较高的表面疏水性，在生物修复初期促进菌株与石油烃的黏附，提高生物修复效果。

1 材料与方法

1.1 材料

海水：2020-07-15 取自浙江省舟山市定海港口近岸石油污染的表层海水。

基础无机盐培养基：NaCl 25 g，KCl 0.7 g，$MgSO_4·7H_2O$ 0.7 g，NH_4NO_3 1 g，KH_2PO_4 2 g，$Na_2HPO_4·2H_2O$ 3 g，蒸馏水 1 L，调节 pH 至 7.5，121 ℃ 灭菌 20 min。添加体积分数为 0.2% 的微量元素（通过 0.22 μm 过滤膜过滤灭菌）。微量元素溶液：$MgSO_4·7H_2O$ 4 g，$CuSO_4·5H_2O$ 1 g，$MnSO_4·H_2O$ 1 g，$FeSO_4·7H_2O$ 1 g，$CaCl_2$ 1 g，蒸馏水 1 L，调节 pH 至 7.5。

LB 培养基：胰蛋白胨 10 g；酵母提取物 5 g；NaCl 10 g；蒸馏水 1 L；调节 pH 至 7.4；LB 培养基盐度为 1、5、10、15 时，NaCl 分别为 10 g、50 g、100 g、150 g。

LB 固体培养基：胰蛋白胨 10 g，酵母提取物 5 g，NaCl 10 g，琼脂 15 g，蒸馏水 1 L，调节 pH 至 7.4。

磷酸盐缓冲液：$K_2HPO_4·3H_2O$ 22.2 g，KH_2PO_4 7.26 g，尿素 1.8 g，$MgSO_4·7H_2O$ 0.2 g，蒸馏水 1 L，调节 pH 至 7.2。

TSA 固体培养基：胰蛋白胨 15 g，大豆蛋白胨 5 g，氯化钠 5 g，琼脂 15 g，蒸馏水 1 L，调节 pH 至 7.3。

海水培养基：NH_4Cl 0.13 g；KH_2PO_4 0.03 g；陈海水 1 L，通过 0.22 μm 过滤膜过滤灭菌。

以上试剂均为分析纯，购自国药集团化学试剂有限公司。表面活性剂：Tween20 和 Tween80 购自国药集团化学试剂有限公司；鼠李糖脂购自美国 AGAE Technologies, LLC；卵磷脂购自阿法埃沙（中国）化学有限公司。

1.2 方法

1.2.1 石油烃降解菌的富集与分离

取 2 L 舟山市定海港口近岸石油污染的表层海水，倒入灭菌后的 4 L 棕色玻璃瓶后密封保存，24 h 内进行微生物的富集培养和分离工作。将采集的水样 1 mL 接种于柴油的体积分数为 0.5% 的 100 mL 灭菌的基础无机盐培养液中。在 30 ℃、180 r/min 的摇床培养 5～6 d 后，从培养液中取出

1 mL 转入 100 mL 新鲜培养基中，培养基的油体积分数提高至 1.0%，在相同的条件下培养；油体积分数梯度为 0.5%、1.0%、1.5%、2.0%、2.5%，富集培养 5 个周期。

用移液枪吸取 1 mL 富集水样置于 9 mL 无菌水中，作为 10^{-1} 稀释液；混匀后，再吸取该试管中的 1 mL 液体置于 9 mL 无菌水中，作为 10^{-2} 稀释液，依此类推，用梯度稀释法分别制成 10^{-3}、10^{-4}、10^{-5}、10^{-6}、10^{-7}、10^{-8} 稀释液；分别吸取 0.2 mL 不同稀释度的样品滴到 LB 固体培养基上，涂布 8 个平板，对应编号，倒置于 35 ℃ 生化培养箱培养 1～2 d；再在平板上挑取单菌落，采取分区划线法，进一步纯化菌株；纯化后的菌株转接于斜面培养基中，并于 4 ℃ 冰箱中保藏。

1.2.2　菌株石油降解能力的测定

以柴油和原油的混合物作为降解油，柴油和原油的质量比为 1∶1。将菌株接种于 LB 液体培养基中，在恒温摇床中 37 ℃、120 r/min 条件下过夜培养。当菌液的 OD_{600} 达到 1.0 时，取 4 mL 菌液，1 726 g 离心力（转速为 3 500 r/min）条件下离心 10 min 收集菌体。将菌体用基础无机盐培养液重悬，接种于油体积分数为 1.5% 的 100 mL 基础无机盐培养基中，在 37 ℃、180 r/min 条件下培养，以未接菌的含相同油体积分数的基础无机盐培养液为对照。14 d 后，用 30 mL 石油醚重复萃取 3 次，采用紫外分光光度法在波长 275 nm 时，测定石油的残余量，计算降解率。该实验设 5 个重复。柴油降解率 η 降解计算公式[7]：

$$\eta = (C_0 - C_1)/C_0 \times 100\%, \tag{1}$$

式中 C_0 和 C_1 分别为对照组石油和接菌组残余油体积分数。

1.2.3　菌株的鉴定与分析

1）菌株形态及生理化鉴定方法

参考《常见细菌鉴定手册》[8] 和《一般细菌常用鉴定方法》[9]，对分离得到的石油降解菌进行革兰氏染色，并观察革兰氏染色的阴阳性和菌体的形态；进行需氧性测定、氧化酶、过氧化氢酶、反硝化、氮源利用、碳源利用等生理生化实验，初步鉴定到属。

2）16S rRNA 基因序列进化分析

细菌基因组提取和 PCR 扩增采用北京全式金公司试剂盒（*TransDirect*® Plant tissue PCR kit），主要过程是在平板上挑取少量菌体于 1.5 mL 微量离心管中，加入 1 mL 无菌生理盐水，重复洗涤 2 次，10 000 g 离心力（转速为 10 611 r/min）条件下离心 1 min，弃上清，收集菌体。沉淀加入 100 μL 试剂盒中的 PD1 裂解液，在沸水中热裂解 10 min，取出，冷却至室温，加入试剂盒中的 PD2 缓冲液 100 μL 中和，得到基因组总 DNA 作为模板。扩增用试剂盒中 2×PCR 预混液，体系为 2 种引物溶液（10 $\mu mol \cdot L^{-1}$）各 1 μL，模板 3 μL，双蒸水20 μL，2×PCR 预混液 25 μL。

扩增 16S rRNA 基因的引物为 27F（5′-AGR GTT TGA TYV TGG CTC AG-3′）和 1492R（5′-GGH TAC CTT GTT ACG ACT T-3′），PCR 扩增程序为 95 ℃ 5 min；94 ℃ 1 min，53 ℃ 45 s，72 ℃ 90 s，30 个循环；72 ℃ 10 min。PCR 产物送上海美吉生物技术有限公司进行双向测序，得到拼接后的测序结果。

获得的 16S rRNA 基因序列在 EzBioCloud（https://www.ezbiocloud.net/）进行比对，同时下载序列相似度高的近缘模式菌株的 16S rRNA 基因序列，采用 Mega 7 软件进行序列比对，对两端裁切平齐后，采用 Neighbor Joining 方法[10] 构建系统发育树。

1.2.4　菌株表面疏水性的测定方法

菌株表面疏水性的测定采用微生物黏着碳烃化合物法（MATH）[11]。取 50 mL 菌液，1 726 g 离心力（转速为 3 500 r/min）条件下离心 10 min 收集菌体。50 mL 无菌水洗 2 遍后用磷酸盐缓冲液重悬菌体。采用紫外分光光度计测定菌液在 600 nm 的吸光度，用磷酸缓冲液稀释至 OD_{600} 约为 1.0，记为 OD_{600}（对照组）。取 5 mL 上述稀释液于 15 mL 离心管中，加入 0.5 mL 柴油，30 ℃ 培养 10 min 后，用

涡旋振荡器充分混匀2 min，静置 10 min。用枪头吸取下层菌液测量其在 600 nm 的吸光度，记为 OD_{600}(实验组)。重复 3 次取其平均值，根据如下公式计算菌株细胞表面疏水性：

$$CSH(\%)\ (菌株细胞表面疏水性) = [OD_{600}\ (对照组) - OD_{600}(实验组)]/OD_{600}\ (对照组) \times 100\%。 \quad (2)$$

1.2.5 培养时间对菌株表面疏水性的影响

挑取平板单菌落至 3 mL LB 液体培养基中，在 30 ℃、180 r/min 条件下过夜培养；将菌液接种至 200 mL LB 液体培养基中，在 30 ℃、180 r/min 条件下培养。每隔 4 h 取菌液 10 mL，测定 OD_{600}，并于 1 726 g 离心力(转速为 3 500 r/min)条件下离心 10 min 后收集菌体，测定菌株的表面疏水性。绘制生长曲线及表面疏水性随时间变化曲线。

1.2.6 盐度对菌株表面疏水性的影响

为明确菌株 H2 在培养过程中提高其表面疏水性的培养条件，考察培养基盐度对菌株表面疏水性的影响规律，以便在后续菌剂制备(扩大培养、发酵等)时提供提高表面疏水性的方法。将菌株从 LB 平板中接种至 3 mL LB 液体培养基中，在 35 ℃、180 r/min 条件下培养 12 h。将 1 mL 菌液接种至 50 mL LB 培养基中，培养基盐度分别为 1、5、10、15，每种盐度接种 3 瓶，置于 35 ℃、180 r/min 摇床中培养约 12 h。取菌液6 mL，测得 OD_{600} 为 1.0 后，1 726 g 离心力(转速为 3 500 r/min)条件下离心 10 min 后收集菌体，测定菌株的表面疏水性。

1.2.7 生长底物对菌株表面疏水性的影响

挑取平板单菌落至 LB 液体培养基中，在 30 ℃、180 r/min 条件下过夜培养。分别取 3 mL 菌液并于 1 726 g 离心力(转速为 3 500 r/min)条件下离心 10 min 后收集菌体，分别接种至 50 mL 海水培养基中。培养基中分别加入 0.5 mL 柴油(疏水性碳源)和 1.1 g 葡萄糖(亲水性碳源)，在 30 ℃、120 r/min 条件下培养 7 d，观察菌株生长情况。然后去除培养液中表层柴油，将培养液倒入 50 mL 的离心管中，1 726 g 离心力(转速为 3 500 r/min)条件下离心 10 min 后收集菌体，测定菌株的表面疏水性。

同时，挑取单菌落接种至 3 mL LB 培养液中，培养 12 h 后将培养液 1 mL 接种至 50 mL LB 培养液中。实验组中加入 1 mL 柴油，对照组不加柴油，置于 30 ℃、180 r/min 条件下培养 16 h。再于 1 726 g 离心力(转速为 3 500 r/min)条件下离心 10 min 后收集菌体，测定菌株的表面疏水性。

1.2.8 表面活性剂对菌株表面疏水性影响的条件设置

表面活性剂分子缔合形成胶束的最低质量浓度称为临界胶束浓度(Critical Micelle Concentration, CMC)。当表面活性剂浓度达到临界胶束浓度时，其物理化学性质如表面张力、密度、黏度、渗透压、电导率等会发生突变，临界胶束浓度常作为表面活性剂表面活性的一种量度[12]。以 Tween20 和 Tween80 作为非离子表面活性剂，以鼠李糖脂作为阴离子表面活性剂，以卵磷脂作为两性离子表面活性剂，研究其对菌株表面疏水性的影响。准确称取表面活性剂溶于去离子水中，用无菌注射器通过滤膜过滤灭菌，分别取表面活性剂水溶液至 50 mL LB 培养基中，充分混匀，使得培养基中表面活性剂的质量浓度为以表面活性剂的临界胶束浓度[13-16]设置的实验质量浓度梯度(表 1)。每个质量浓度设置 3 个平行样，以不加表面活性剂的为空白对照。将菌株接种至培养基中，30 ℃、120 r/min 培养 12 h，并于 1 726 g 离心力(转速为 3 500 r/min)条件下离心 10 min，收集菌体，测定菌株的表面疏水性。

表 1 添加的表面活性剂种类及质量浓度

Table 1 Types and mass concentrations of surfactants added

种 类	表面活性剂	质量浓度梯度/($mg \cdot L^{-1}$)
非离子表面活性剂	Tween20	30、60、90、120
	Tween80	3.5、7.0、14.0、28.0
阴离子表面活性剂	鼠李糖脂	20、40、80、120
两性离子表面活性剂	卵磷脂	80、120、160、320

1.3　统计学分析

菌株表面疏水性数据采用 Excel 软件进行统计分析。2 组间数据采用 t 检验，计算 P 值，$P<0.05$ 则说明两组菌株表面疏水性具有显著性差异。

2　结果与分析

2.1　石油烃降解菌的分离筛选及疏水性测定

经过驯化和纯化分离，共分离获得 5 株能以柴油作为唯一碳源的降解菌株，分别命名为 B5、H2、J1、Q1、Q4，并测定菌株的疏水性（表 2）。选择其中疏水性最高的菌株 H2，在油体积分数为 1.5%，37 ℃、180 r/min 条件下，菌株 H2 对柴油与原油混合物的 14 d 降解率为 18.67%。

表 2　分离筛选获得的菌株疏水性

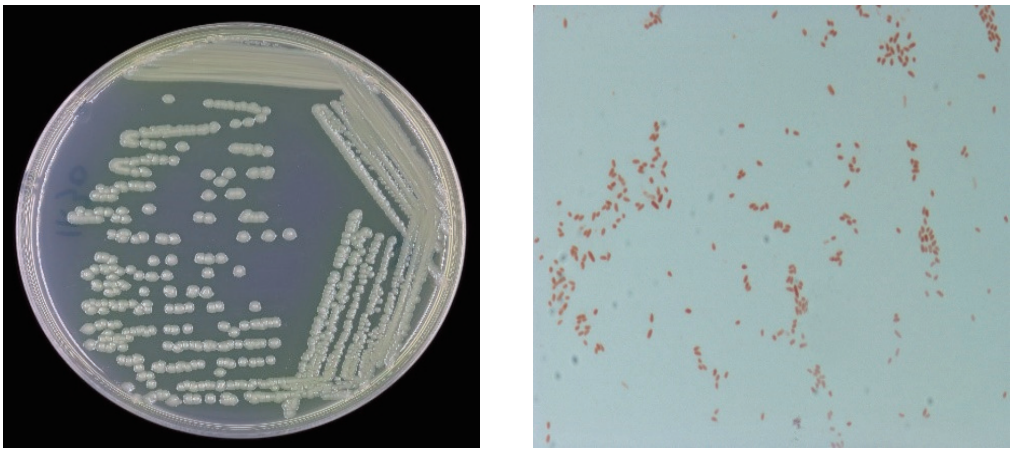
Table 2　Hydrophobicity of strains obtained by isolation and screening

菌　株	OD_{600}（对照组）	OD_{600}（实验组）	表面疏水性/%
B5	1.01	0.80	20.79
H2	1.10	0.83	24.55
J1	1.12	1.11	0.89
Q1	1.03	0.99	3.88
Q4	1.00	0.87	13.00

2.2　菌株的鉴定

2.2.1　菌株形态及生理化鉴定

菌株 H2 在 TSA 平板上 30 ℃ 培养 2 d 后，菌落呈圆形或近圆形，直径 1～2 mm，近米绿色。表面光滑、湿润，中央稍隆起，边缘整齐。产绿色水溶性色素。革兰染色阴性，细胞杆状，宽为 0.5～0.8 μm，长为 0.8～1.5 μm（图 1）。通过非肠道革兰氏阴性菌鉴定系统（API 20 NE）鉴定菌株 H2 生理生化特征（表 3）。



(a) 菌株的菌落　　(b) 菌株的菌体形态

图 1　菌株 H2 的菌落及菌体形态

Fig. 1　Colony and cell morphology of the strain H2

表 3 API 20 NE 鉴定 H2 菌株生理生化特征

Table 3 Physiological and biochemical characteristics of H2 strain identified by API 20 NE

生理生化特征	菌株 H2	生理生化特征	菌株 H2	生理生化特征	菌株 H2
过氧化氢酶	+	精氨酸双水解酶	+	N-乙酰葡萄糖胺同化	+
氧化酶	+	脲酶	—	麦芽糖同化	—
淀粉水解	—	*β*-葡萄糖苷酶	—	葡萄糖酸盐同化	+
4 ℃ 生长	+	蛋白酶	+	癸酸同化	+
41 ℃ 生长	—	*β*-半乳糖苷酶	—	己二酸同化	—
脓青素	—	葡萄糖同化	+	苹果酸同化	+
硝酸盐还原	—	阿拉伯糖同化	+	柠檬酸同化	+
吲哚形成	—	甘露糖同化	+	苯乙酸同化	—
葡萄糖产酸	—	甘露醇同化	+		

注：+表示阳性，—表示阴性。

2.2.2 16s rRNA 基因序列系统发育分析

H2 菌株 16S rRNA 序列与近缘种的模式菌株的 16S rRNA 基因序列构建系统发育树（图 2）。H2 菌株与副乳假单胞菌（*Pseudomonas paralactis*）的 16S rRNA 基因序列相似性为 100%，与乳假单胞菌（*Pseudomonas lactis* WS4672^T）和产氮假单胞菌（*Pseudomonas azotoformans* DSM 18862^T）均为 99.93%，并在系统发育树上属于同一簇（cluster）。由此可确定该菌株属于假单胞菌属（*Pseudomonas*），与副乳假单胞菌（*Pseudomonas paralactis*）的亲缘关系最近。

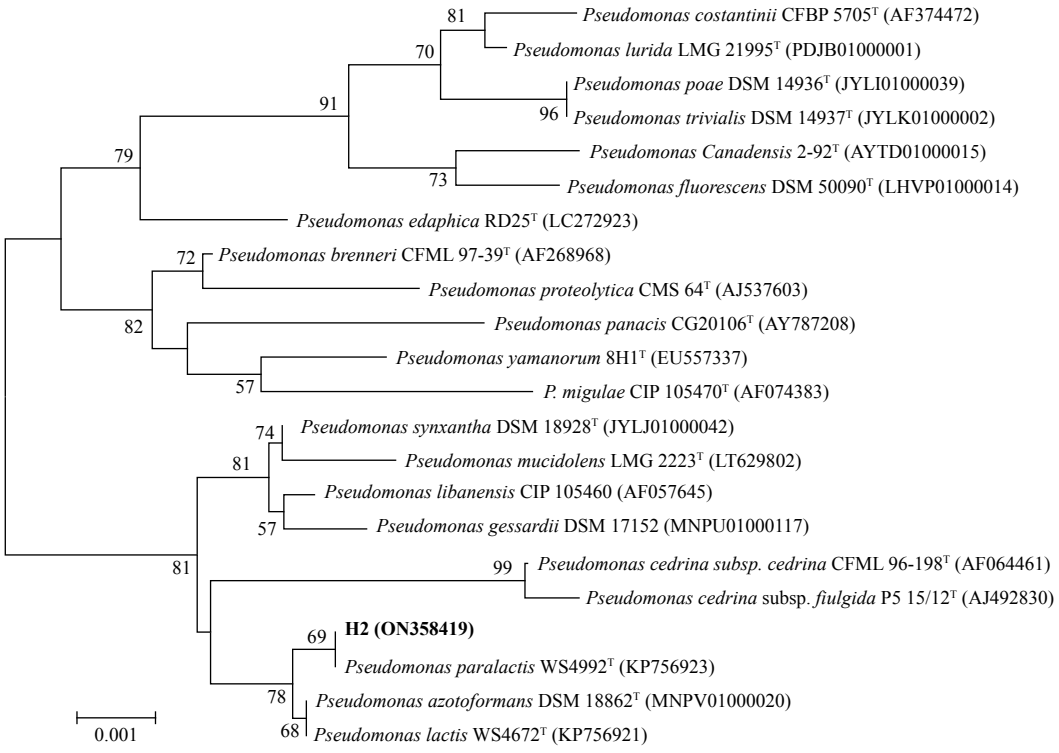


图 2 基于 16S rRNA 基因序列（1405 碱基）的 H2 菌株邻接法系统发育树

Fig. 2 Phylogenetic tree of H2 strain based on 16S rRNA gene sequence (1405 bases)

2.3　培养时间对菌株表面疏水性的影响

以培养时间为横坐标，菌液的 OD_{600} 和菌株的表面疏水性为纵坐标，绘制菌株 H2 在 LB 培养基中的生长曲线和细胞表面疏水性随培养时间的变化（图 3）。随着培养时间的增加，菌液的 OD_{600} 值逐渐增加。菌株培养 4～56 h 处于对数生长期和稳定期，细胞的表面疏水性随培养时间的增加逐渐增大。菌株培养 56～72 h 处于衰老期，细胞的表面疏水性随培养时间的增加逐渐降低。

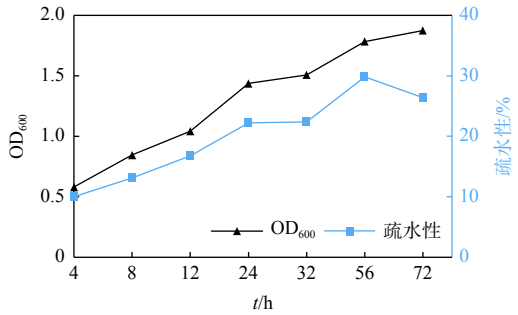


图 3　培养时间对菌株 H2 表面疏水性的影响

Fig. 3　Effect of incubation time on the surface hydrophobicity of strain H2

2.4　盐度对菌株表面疏水性的影响

菌株分别在盐度为 1、5、10、15 的 LB 培养基中培养。盐度对其表面疏水性的影响（图 4）表明，在盐度为 1 的 LB 培养基中，菌株 H2 的疏水性为 43.56%；随着培养基盐度的提高，菌株表面疏水性显著降低（$P<0.01$）；当 LB 培养基盐度为 15 时，菌株 H2 的疏水性下降到 7.52%。可能是由于当 NaCl 浓度较高时，菌株周围环境的渗透压受到影响，影响到了菌体细胞壁表面的蛋白质活性和成分，最终使菌株的表面疏水性降低。这与刘洋等的研究结果[17]一致。我们通过研究菌株在 LB 培养基中不同盐度对其表面疏水性的影响，为菌株的扩大培养提供提高疏水性的方法，后续将进一步开展海水盐度对其表面疏水性的影响实验，研究其在海水中表面疏水性的变化规律。

2.5　生长底物对菌株表面疏水性的影响

不同碳源对菌株表面疏水性的影响（图 5）显示，在海水中在以柴油作为唯一碳源时，表面疏水性达到了 67.10%；以葡萄糖作为唯一碳源时，只有 5.72%。在 LB 培养基中加入柴油后，相对于不加柴油的 LB 培养基培养的菌株，菌株的表面疏水性无显著变化，这可能由于 LB 培养基中存在其他易用的碳源。由此可见，当培养基中以疏水性碳源作为生长底物时，菌株的表面疏水性要显著高于以亲水性碳源作为生长底物的（$P<0.01$），即生长底物可显著改变菌株的表面疏水性。

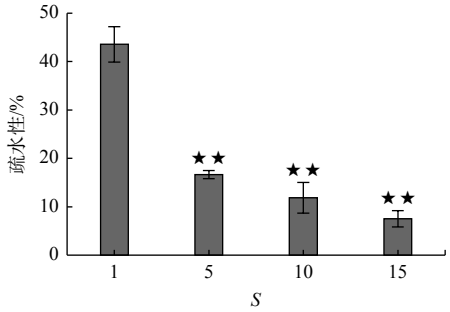


图 4　盐度对菌株 H2 表面疏水性的影响

（★★：与对照组相比 $P<0.01$）

Fig. 4　Effects of salinity on the surface hydrophobicity of strain H2 (★★: comparing with the control group $P<0.01$)

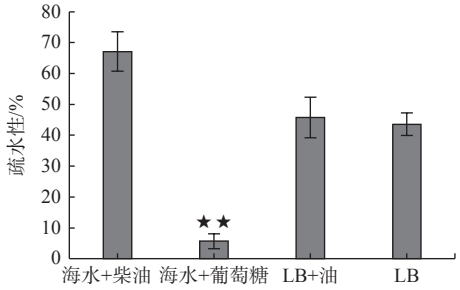


图 5　柴油与葡萄糖对菌株 H2 表面疏水性的影响

（★★：与对照组相比 $P<0.01$）

Fig. 5　Effects of diesel oil and glucose on the surface hydrophobicity of the strain H2 (★★: comparing with the control group $P<0.01$)

2.6 表面活性剂对菌株表面疏水性的影响

2.6.1 非离子表面活性剂对菌株表面疏水性的影响

选取 Tween20 和 Tween80 作为非离子表面活性剂，研究其对菌株培养过程中表面疏水性的影响。Tween20 为水包油（O/W）型乳化剂，分子中含有较多的亲水性基团，亲水性强，HLB（Hydrophilic Lypophili Balance）值为 16.7[18]。Tween 80 属多元醇型非离子表面活性剂，也是 1 种亲水性的表面活性剂，HLB 值为 15.0[19]。不同质量浓度的 Tween20 对菌株 H2 扩大培养时的表面疏水性的影响（图 6）显示，Tween20 的临界胶束浓度为 60 mg/L，当添加 Tween20 质量浓度为 30 mL（小于临界胶束浓度）时，菌株 H2 的表面疏水性达到最大（38.27%）；当添加 Tween20 的质量浓度为临界胶束浓度 60 mg/L 时，菌株 H2 的表面疏水性为 26.41%，与空白对照组（32.81%）相比降低；添加的质量浓度大于临界胶束浓度时疏水性降低，如当添加 Tween20 的质量浓度为 120 mg/L 时，疏水性与空白对照组相比显著降低（$P<0.05$），仅为 5.19%。不同质量浓度 Tween80 对菌株 H2 的表面疏水性的影响（图 7）显示，Tween80 的临界胶束浓度为 14 mg /L，当添加 Tween80 的质量浓度小于临界胶束浓度时，随着添加质量浓度的提高，菌株 H2 的表面疏水性不断升高；在临界胶束浓度时，菌株表面疏水性相对于空白对照组（29.06%）显著升高（$P<0.05$），达到了 42.62%；当添加 Tween80质量浓度为 28 mg/L（大于临界胶束浓度）时，菌株 H2 的表面疏水性显著降低（$P<0.05$），仅为 19.59%。

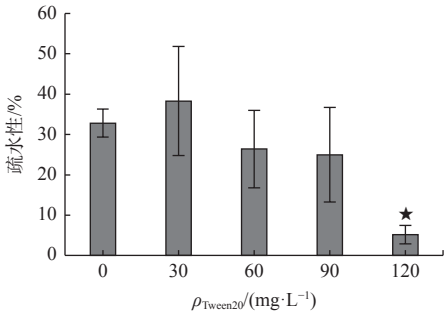


图 6 Tween20 对菌株 H2 表面疏水性的影响
（★：与对照组相比 $P<0.05$）

Fig. 6 Effects of Tween20 on the surface hydrophobicity of strain H2 (★: comparing with the control group $P<0.05$)

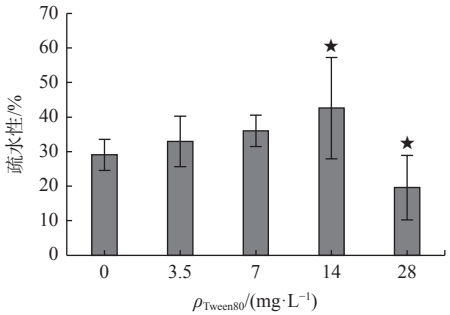


图 7 Tween80 对菌株 H2 表面疏水性的影响
（★：与对照组相比 $P<0.05$）

Fig. 7 Effects of Tween80 on the surface hydrophobicity of strain H2 (★: comparing with the control group $P<0.05$)

2.6.2 阴离子表面活性剂对菌株表面疏水性的影响

鼠李糖脂是由假单胞菌或伯克氏菌类产生的 1 种生物代谢性质的生物表面活性剂，属于 1 种糖脂类的阴离子表面活性剂[20]，它的结构是由 1 或 2 个鼠李糖（亲水基）链接 1 或 2 个饱和或不饱和的脂肪酸（疏水基）构成[21]。不同质量浓度的鼠李糖脂对菌株 H2 的表面疏水性的影响（图 8）显示，相对于空白对照组的疏水性 32.00%，添加不同质量浓度的鼠李糖脂均会降低菌株 H2 的表面疏水性；当添加鼠李糖脂的质量浓度为20 mg/L 时，疏水性为 11.39%，呈显著降低（$P<0.01$）；当添加的质量浓度为鼠李糖脂的临界胶束浓度40 mg/L 时，疏水性为 24.95%，相对于空白对照（32.00%），疏水性降低了 7.05%；当添加的质量浓度大于鼠李糖脂的临界胶束浓度时，疏水性先升高再降低，在质量浓度为 80 mg/L 时，菌株 H2 的疏水性达到最大（29.74%），相对于空白对照（32.00%），仍降低了 2.26%。研究表明，在许多细菌中细胞表面疏水性和细胞表面电荷有一定的关系[22]，Zeng 等[23] 认为鼠李糖脂的质量浓度过高会使菌体表面的负电荷下降，这可能是由于鼠李糖脂使细胞表面的化学结

构发生了改变，导致了菌株 H2 的表面疏水性降低。

2.6.3　两性离子表面活性剂对菌株表面疏水性的影响

卵磷脂是磷脂酸的衍生物，由磷脂酸中的磷酸酯与羟基化合物-胆碱中的羟基连接成酯，是 1 种两性离子表面活性剂，亲水基为磷酸上的 H 和胆碱上的-OH，疏水基是脂肪酸的烃基[24]。添加卵磷脂后菌株 H2 的表面疏水性都显著低于未添加的对照组（$P<0.01$），且菌株的细胞表面疏水性随着卵磷脂质量浓度的提高而下降（图 9）。当添加的质量浓度为 160 mg/L（接近卵磷脂的临界胶束浓度 164 mg/L）时，菌株 H2 的表面疏水性为 1.27%，相对于空白对照组的疏水性（33.32%），显著降低（$P<0.01$）；当添加卵磷脂的质量浓度为 320 mg/L时，菌株表面疏水性降至最低为 0.55%，相对于空白对照组的疏水性（33.32%），疏水性降低了 32.77%，这可能是由于卵磷脂可在菌株细胞上附着，导致其疏水性的降低。

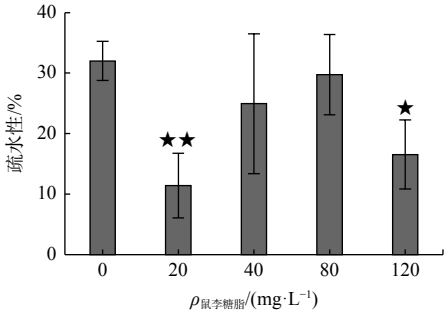


图 8　鼠李糖脂对菌株 H2 表面疏水性的影响（★：与对照组相比 $P<0.05$；★★：与对照组相比 $P<0.01$）

Fig. 8　Effects of rhamnolipid on the surface hydrophobicity of strain H2 (★: comparing with the control group $P<0.05$; ★★: Comparing with the control group $P<0.01$)

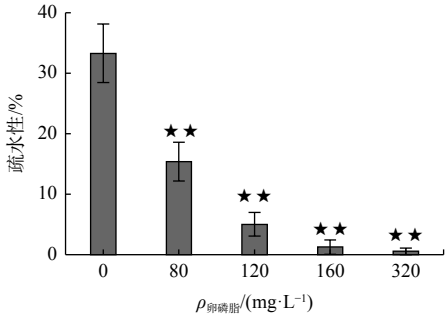


图 9　卵磷脂对菌株 H2 表面疏水性的影响（★★：与对照组相比 $P<0.01$）

Fig. 9　Effects of lecithin on the surface hydrophobicity of strain H2 (★★: comparing with the control group $P<0.01$)

3　讨　论

研究表明，细胞表面疏水性较高的微生物在石油污染生物修复方面具有非常大的优势[25]。王鑫等[21] 研究发现，细菌表面疏水性大小与其对污染物降解能力呈一定相关性，细胞表面疏水性大的菌株的降解能力相对于疏水性小的降解能力高；赵晴等[26] 研究表明细菌的表面疏水性与其对石油污染环境的治理能力呈一定的关系，疏水性大的石油降解菌对有机物的降解速率要比疏水性小的大；Hamada 等[27] 认为，细菌的表面疏水性有利于单环芳烃的羟基化，从而提高其生物转化效率，进而提高石油降解率。尽管微生物表面疏水性与黏附作用之间的关系研究较多，但通过提高石油降解菌表面疏水性促进其与石油烃黏附，以增加生物降解效率，并应用于海洋石油污染生物修复相关研究却很少。从海洋环境中分离获得具有表面疏水性的石油烃降解细菌，并在培养过程中提高其表面疏水性，再将具有高表面疏水性的菌株接种至海洋环境中，可以在生物修复初期促进微生物与石油烃的黏附，从而提高生物修复效果。

通过研究石油降解土著菌表面疏水性的变化规律，为其应用于石油污染的生物修复提供基础。微生物表面物质十分复杂[17]，细胞表面蛋白中疏水端氨基酸的含量以及磷脂分子层会影响到细菌表面的疏水性。赵晴等[26] 研究发现由于菌株的衰老，细菌的表面疏水位点减少，与有机相柴油的疏

水作用逐渐减弱，无法克服其自身重力吸附到有机相柴油的表面。孙向武等[28]研究发现，处于对数期的菌株具有较高的细胞表面疏水性，并随着菌株培养时间的增加细胞表面疏水性不断降低。菌株 *Pseudomonas* sp. H2 的表面疏水性在其对数生长期随着培养时间增加，在其稳定期达到最大值。因此，应在其对数生长期或者稳定期接种至石油污染水体中以提高菌株与石油烃的黏附。

生长碳源对菌株的表面疏水性具有重要影响，以柴油为生长碳源培养菌株 *Pseudomonas* sp. H2 的表面疏水性远高于以葡萄糖为碳源培养菌株的表面疏水性，这说明亲油性碳源中生长的菌株表面疏水性更高。Kaczorek 等[29]的研究也表明嗜水气单胞菌气单胞菌（*Aeromonas hydrophila*）在以柴油为唯一碳源培养的菌种疏水性约为 31%；在以葡萄糖为唯一碳源的条件下培养的菌种疏水性最差，约为 5%。因此，采用亲油性的碳源培养菌株 H2 可提高其表面疏水性。

表面活性剂具有增溶、乳化、渗透、润湿、脱附等作用，在农业、环境修复等领域被广泛地应用[30]。细胞表面疏水性与菌体表面脂多糖的含量密切相关，加入表面活性剂使菌株的疏水性发生变化，一方面可能是由于菌株细胞壁的脂多糖溶出，减少细胞表面的脂多糖含量；另一方面，可能是由于表面活性剂的亲水端与疏水性的菌株表面发生结合，从而使疏水性的磷脂端暴露出来[31-34]。但有研究表明，表面活性剂往往容易使得细胞与石油烃分离，不利于石油烃与微生物的黏附[35]，这也是很多研究者在研究表面活性剂对石油烃生物降解中的作用时得出不同结论的一个原因。我们分别研究了非离子表面活性剂、阴离子表面活性剂、两性离子表面活性剂在菌株 H2 培养过程对其表面疏水性的影响，而非在生物降解过程中添加表面活性剂，避免了表面活性剂导致的细胞与石油烃分离。不同表面活性剂在不同浓度下对表面疏水性的影响作用不同，非离子表面活性剂 Tween20、Tween80 分别在质量浓度 30 mg/L、14 mg/L 时，可提高菌株 H2 的表面疏水性；而阴离子表面活性剂鼠李糖脂、两性离子表面活性剂卵磷脂则降低菌株 H2 的表面疏水性。因此，在采用添加表面活性剂提高菌株表面疏水性时需要考虑表面活性剂的种类和质量浓度。

4 结 论

我们从浙江省舟山市定海港口近岸表层污染的海水中分离获得 5 株能以柴油作为唯一碳源的降解菌株，筛选 1 株能较好降解石油且具有表面疏水性的菌株 H2，经进行生理生化和 16S rRNA 测定，研究了其自身特性及表面疏水性的变化规律，得到如下 4 点结论。

1）菌株 H2 属于假单胞菌属（*Pseudomonas*），与副乳假单胞菌（*Pseudomonas paralactis*）的亲缘关系最近。

2）菌株 H2 在对数生长期和稳定期的细胞表面疏水性随菌株培养时间增加而增大；在衰老期，表面疏水性随菌株培养时间的增加而降低。

3）菌株 H2 表面疏水性随培养基盐度升高而降低；以疏水性柴油作为唯一碳源培养时的菌株疏水性远高于以亲水性葡萄糖作为唯一碳源的。

4）在菌株培养过程中加入表面活性剂会使菌株的表面疏水性发生改变，非离子表面活性剂 Tween20、Tween80 质量浓度分别为 30 mg/L、14 mg/L 时，可提高菌株 H2 的表面疏水性；而阴离子表面活性剂鼠李糖脂、两性离子表面活性剂卵磷脂则降低菌株 H2 的表面疏水性。

参考文献 (References):

[1] 唐景春, 吕宏虹, 刘庆龙, 等. 石油烃污染及修复过程中的微生物分子生态学研究进展[J]. 微生物学通报, 2015, 42(5): 944-955. TANG J C, LÜ H H, LIU Q L, et al. Recent review on the microbial molecular ecology during contamination and remediation of petroleum hydrocarbons[J]. Microbiology China, 2015, 42(5): 944-955.

[2] ABBASNEZHAD H, GRAY M, FOGHT J M. Influence of adhesion on aerobic biodegradation and bioremediation of liquid hydrocarbons[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 92(4): 653-675.

[3] CHAKRABORTY S, MUKHERJI S, MUKHERJI S. Surface hydrophobicity of petroleum hydrocarbon degrading *Burkholderia* strains and their interactions with NAPLs and surfaces[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010, 78(1): 101-108.

[4] LIU Y, TANG S X, FERNANDEZ-LOZANO C, et al. Experimental study and random forest prediction model of microbiome cell surface hydrophobicity[J]. Expert Systems Applications, 2017, 72(NO.C): 306-316.

[5] CHEN Z W, JI H W, ZHAO C Q, et al. Individual surface-engineered microorganisms as robust Pickering interfacial biocatalysts for resistance-minimized phase-transfer bioconversion[J]. Angewandte Chemie, 2015, 54(16): 4904-4908.

[6] LI Y M, GONG H Y, CHENG H, et al. Individually immobilized and surface-modified hydrocarbon-degrading bacteria for oil emulsification and biodegradation[J]. Marine Pollution Bulletin, 2017, 125(1/2): 433-439.

[7] 孙成. 环境监测实验[M]. 北京: 科学出版社, 2003: 66-68. SUN C. Environmental monitoring experiment[M]. Beijing: Science Press, 2003: 66-68.

[8] 东秀珠, 蔡妙英. 常见细菌系统鉴定手册[M]. 北京: 科学出版社, 2001: 370-410. DONG X Z, CAI M Y. Handbook of systematic identification of common bacteria[M]. Beijing: Science Press, 2001: 370-410.

[9] 中国科学院微生物研究所细菌分类组. 一般细菌常用鉴定方法[M]. 北京: 科学出版社, 1978: 114-115, 125-127. Bacterial Classification Group, Institute of Microbiology, Chinese Academy of Sciences. Common identification methods for general bacteria[M]. Beijing: Science Press, 1978: 114-115, 125-127.

[10] SAITOU N, NEI M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetic trees[J]. Molecular Biology and Evolution, 1987, 4(4): 406-425.

[11] ROSENBERG M. Basic and applied aspects of microbial adhesion at the hydrocarbon: water interface[J]. Critical Reviews in Microbiology, 1991, 18(2): 159-173.

[12] 张晓光. 表面张力法和电导法对比测定表面活性剂临界胶束浓度[J]. 化学教育, 2021, 42(18): 134-136. ZHANG X G. Comparative of determination surfactant critical micelle concentration by surface tension and conductivity methods[J]. Chinese Journal of Chemical Education, 2021, 42(18): 134-136.

[13] 赵淑梅, 郑西来, 高增文, 等. 生物表面活性剂及其在油污染生物修复技术中的应用[J]. 海洋科学进展, 2005, 23(2): 234-238. ZHAO S M, ZHENG X L, GAO Z W, et al. Biosurfactant and its application to bioremediation for oil pollution[J]. Advance in Marine Science, 2005, 23(2): 234-238.

[14] 刘红, 王芬, 刘丽, 等. 稳态荧光法研究Tween 80/Solutol HS15体系的临界胶束浓度[J]. 西南大学学报: 自然科学版, 2013, 35(12): 170-176. LIU H, WANG F, LIU L, et al. Determination of critical micelle concentration for Tween 80/Solutol HS15 with the steady-state fluorescence method[J]. Journal of Southwest Petroleum University: Science & Technology Edition, 2013, 35(12): 170-176.

[15] 梁生康, 王修林, 单宝田. 生物表面活性剂强化疏水性有机污染物生物降解研究进展[J]. 化工环保, 2005, 25(4): 276-280. LIANG S K, WANG X L, SHAN B T. Development of biosurfactant-enhanced biodegradation of hydrophobic organic pollutants[J]. Environment Protection of Chemical Industry, 2005, 25(4): 276-280.

[16] 刘天晴, 汤瑶, 禹克伟. 电容法研究卵磷脂/氨基酸/H_2O胶束和囊泡体系[J]. 物理化学学报, 2010, 26(2): 311-316. LIU T Q, TANG Y, YU K W. Study on Lecithin/Amino Acid/H_2O micelle and liposome systems by capacitance method[J]. Wuli Huaxue Xuebao, 2010, 26(2): 311-316.

[17] 刘洋, 李蔚, 单厚菲, 等. 细胞疏水性对采油微生物运移吸附作用的影响[J]. 西南石油大学学报: 自然科学版, 2009, 31(5): 117-120,204. LIU Y, LI W, SHAN H F, et al. Effects of cell surface-hydrophobicities on migration and adhension of oilrecovering microbe[J]. Journal of Southwest Petroleum University: Science & Technology Edition, 2009, 31(5): 117-120,204.

[18] 杨建刚, 刘翔, 余刚, 等. 非离子表面活性剂Tween20对菲生物降解的影响[J]. 环境科学, 2004, 25(1): 53-56. YANG J G, LIU X, YU G, et al. The influence on the biodegradation of phenanthrene by nonionic surfactant Tween20[J]. Environment Science, 2004, 25(1): 53-56.

[19] 李韵, 李薇, 王冰, 等. 混合表面活性剂修复四氯乙烯土壤污染[J]. 科技通报, 2016, 32(2): 218-223. LI Y, LI W, WANG B, et al. Research on remediation mechanism of soil contaminated by perchloroethylene using mixed surfactant[J]. Bulletin of Science and Technology, 2016, 32(2): 218-223.

[20] 钟华, 曾光明, 黄国和, 等. 生物表面活性剂对土壤中微生物降解疏水性有机物的作用机制[J]. 高技术通讯, 2006, 13(3): 325-330. ZHONG H, ZENG G M, HUANG G H, et al. Effects of biosurfactants on biodegradation of soil HOCs: from the microbial aspect[J]. Chinese High Technology Letters, 2006, 13(3): 325-330.

[21] 王鑫, 王学江, 刘免, 等. 石油降解菌的细胞表面疏水特性研究[J]. 环境工程学报, 2014, 8(8): 3519-3523. WANG X, WANG X J, LIU M, et al. Study on cell-surface hydrophobicity characteristics of oil degrading strains[J]. Chinese Journal of Environmental Engineering, 2014, 8(8): 3519-3523.

[22] RUHAL R, ANTTI H, RZHEPISHEVSKA O, et al. A multivariate approach to correlate bacterial surface properties to biofilm formation by lipopolysaccharide mutants of Pseudomonas aeruginosa[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2015, 127: 182-191.

[23] ZENG G M, LIU Z F, ZHONG H, et al. Effect of monorhamnolipid on the degradation of n-hexadecane by Candida tropicalis and the association with cell surface properties[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2011, 90(3): 1155-1161.

[24] CAMEOTRA S S, MAKKAR R S, KAUR J, et al. Synthesis of biosurfactants and their advantages to microorganisms and mankind[J]. Oxygen Transport to Tissue XXXIII, 2009, 672: 261-280.

[25] SHAKIROVA L, AUZINA L, GRUBE M, et al. Relationship between the cell surface hydrophobicity and survival of bacteria Zymomonas mobilis after exposures to ethanol, freezing or freeze-drying[J]. Journal of Industrial Microbiology & Biotechnology, 2008, 35(10): 1175-1180.

[26] 赵晴, 张甲耀, 陈兰洲, 等. 疏水性石油烃降解菌细胞表面疏水性及降解特性[J]. 环境科学, 2005, 26(5): 132-136. ZHAO Q, ZHANG J Y, CHEN L Z, et al. Cell-surface hydrophobicity and degradation characteristics of hydrophobic hydrocarbon degrading bacteria[J]. Environmental Science, 2005, 26(5): 132-136.

[27] HAMADA T, MAEDA Y, MATSUDA H, et al. Effect of cell-surface hydrophobicity on bacterial conversion of water-immiscible chemicals in two-liquid-phase culture systems[J]. Journal of Bioscience and Bioengineering, 2009, 108(2): 116-120.

[28] 孙向武, 曹晓丹, 戴青华. 1, 4-二氯苯降解菌的疏水性及其降解特性研究[J]. 环境科学与技术, 2010, 33(1): 458-461. SUN X W, CAO X D, DAI Q H. Hydrophobicity and characterization of dichlorobenzene-degrading bacterial strain[J]. Environment Science & Technology, 2010, 33(1): 458-461.

[29] KACZORE E, URBANOWICZ M, OLSZANOWSKI A. The influence of surfactants on cell surface properties of Aeromonas hydrophila during diesel oil biodegradation[J]. Colloids and Surfaces B: Biointerfaces, 2010, 81(1): 363-368.

[30] VARJANI S, UPASANI V N. Evaluation of rhamnolipid production by a halotolerant novel strain of Pseudomonas aeruginosa[J]. Bioresource Technology, 2019, 288: 121577.

[31] 曹月, 郭鹏, 朱莹, 等. 高效柴油降解菌细胞表面疏水性及降解特性[J]. 环境与健康杂志, 2018, 35(12): 1078-1084,1128. CAO Y, GUO P, ZHU Y, et al. Cell-surface hydrophobicity and degradation characteristics of high-efficient diesel oil-degrading bacteria[J]. Journal of Environment and Health, 2018, 35(12): 1078-1084,1128.

[32] AL-TAHHAN R A, SANDRIN T R, BODOUR A A, et al. Rhamnolipid-induced removal of lipopolysaccharide from Pseudomonas aeruginosa: effect on cell surface properties and interaction with hydrophobic substrates[J]. Applied and Environmental Microbiology, 2000, 66(8): 3262-3268.

[33] CHEN D Z, JIANG N X, YE J X, et al. Comparative investigation on a hexane-degrading strain with different cell surface hydrophobicities mediated by starch and chitosan[J]. Applied Microbiology and Biotechnology, 2017, 101(9): 3829-3837.

[34] RANDHAWA K K S, RAHMAN P K S M. Rhamnolipid biosurfactants-past, present, and future scenario of global market[J]. Frontiers in Microbiology, 2014, 5(5): 454.

[35] RODRIGUES L R, BANAT I M, VAN DER MEI H C, et al. Interference in adhesion of bacteria and yeasts isolated

from explanted voice prostheses to silicone rubber by rhamnolipid biosurfactants[J]. Journal of Applied Microbiology, 2006, 100(3): 470-480.

Identification and Study on Surface Hydrophobicity of a Marine Oil-Degrading Bacteria

WANG Yunfei[1], LUO Qun[2], CHEN Qingguo[1], SUN Wuyang[1], ZHU Baikang[1]

（1. *Zhejiang Ocean University*, Zhoushan 316022, China；
2. *Naval Medical Center*, *Chinese People's Liberation Army*, Shanghai 200433, China）

Abstract: The surface hydrophobicity of microorganisms is one of the main factors affecting the absorption and degradation of hydrophobic organic matter. Improving the surface hydrophobicity of microorganisms can help them adhere to the surface of petroleum hydrocarbon, thus effectively reducing the mass transfer distance of petroleum hydrocarbon and improving its bioavailability. A strain with surface hydrophobicity that can use petroleum hydrocarbon as the only carbon source was isolated through enrichment culture from the polluted seawater of Dinghai Port in Zhoushan City. The physiological and biochemical identification and 16S rRNA gene sequence evolution analysis of the strain were conducted. The effects of incubation time, salinity, substrate and surfactants on the surface hydrophobicity of this strain were studied. The results showed that this strain belonged to the genus Pseudomonas, which was the closest relative to Pseudomonas paralactis, and was named as strain H2. The surface hydrophobicity increased with the increase of culture time when the strain was in logarithmic growth and stable stages. In the aging stage, the surface hydrophobicity decreased gradually with the increase of culture time. The increase of medium salinity reduced the surface hydrophobicity of the strain. When the hydrophobic diesel oil was used as the only carbon source, the surface hydrophobicity of the strain was much higher than that of hydrophilic glucose. The surface hydrophobicity of strain H2 was changed by adding surfactants in the culture process. The surface hydrophobicity was improved when non-ionic surfactants of Tween20 and Tween80 were added at the mass concentration of 30 mg/L and 14 mg/L, respectively. However, the anionic surfactant (rhamnolipid) and ampholytic surfactant (lecithin) reduced the surface hydrophobicity of strain H2.

Key words: oil pollution；isolation and identification；pseudomonas paralactis；cell surface hydrophobicity

Received: March 4, 2022